



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>B01J 19/00</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/47317</b> (43) Date de publication internationale: 17 août 2000 (17.08.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00289</p> <p>(22) Date de dépôt international: 8 février 2000 (08.02.00)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 99/01438 8 février 1999 (08.02.99) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LIVACHE, Thierry [FR/FR]; 18, Les Simianes, F-38560 Haute Jarrie (FR). LESBRE, Frédéric [FR/FR]; 18, rue de la Gare, F-38120 Saint Egrève (FR).</p> <p>(74) Mandataire: DES TERMES, Monique; Brevatome, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(54) Title: METHOD FOR PRODUCING ADDRESSED LIGAND MATRIXES ON A SUPPORT</p> <p>(54) Titre: PROCEDE DE FABRICATION DE MATRICES DE LIGANDS ADRESSES SUR UN SUPPORT</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a method for producing addressed ligand matrixes on a support. According to the inventive method, an element such as a reservoir (1) that is filled with a ligand and comprising an electrode (3) is used to deposit and electrochemically fix the ligand on a conducting support (7). The ligand can be an oligonucleotide or a peptide and fixing can occur by means of electrocopolymerisation of said oligonucleotide or peptide or a polypeptide containing a pyrrole group in 5' with pyrrole.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne un procédé de fabrication de matrices de ligands adressés sur un support. Selon ce procédé, on utilise un élément tel qu'un réservoir (1) rempli de ligand et comportant une électrode (3) pour déposer et fixer électrochimiquement le ligand sur le support conducteur (7). Le ligand peut être un oligonucléotide ou un peptide et la fixation peut être obtenue par électrocopolymérisation de cet oligonucléotide ou peptide portant un groupe pyrrole en 5' avec du pyrrole.</p> <div data-bbox="938 1163 1451 1684" data-label="Image"> </div>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

# PROCEDE DE FABRICATION DE MATRICES DE LIGANDS ADRESSES SUR UN SUPPORT.

## DESCRIPTION

### Domaine technique

5                   La présente invention a pour objet un procédé de fabrication de matrices de ligands adressés sur un support.

                  Les ligands peuvent être des produits naturels ou synthétiques ayant une activité biologique  
10                   ou une affinité pour des molécules biologiques ou autres, par exemple des peptides, des oligonucléotides, des récepteurs ou d'autres molécules d'intérêt biologique. Des matrices de ce type peuvent trouver de nombreuses applications, notamment pour la détection et  
15                   l'identification de constituants dans des échantillons biologiques ainsi que pour le criblage de bibliothèques de molécules. De telles matrices peuvent être en particulier des matrices de sondes oligonucléotidiques.

### 20   État de la technique antérieure

                  Depuis quelques années, on a développé plusieurs procédés de fabrications de matrices de ce type. Ainsi, on connaît trois méthodologies dans lesquelles on réalise l'adressage, soit par voie  
25                   photochimique, soit par voie mécanique, soit par voie électrochimique.

Dans le document Fodor S. et al, Science, 1991, 251, pages 767-773 [1], on a décrit un procédé de réalisation d'une matrice d'oligonucléotides par adressage photochimique. Selon ce procédé, on part d'un support fonctionnalisé par des groupes fonctionnels protégés par des groupes protecteurs photolabiles, on élimine ensuite ces groupes protecteurs, par irradiation à travers un masque, sur les sites qui devront être couplés aux molécules d'intérêt biologique, puis on réalise le couplage de ces molécules sur les groupes fonctionnels déprotégés.

Ce mode d'adressage photochimique présente l'inconvénient de nécessiter un grand nombre de masques différents pour réaliser l'ensemble des opérations de couplage.

Les documents : Khrapko K. R. et al, DNA Sequence -I.DNA Sequencing and Mapping, 1991, volume 1, pages 375 à 388 [2] et GB-A-2 319 838 [3] décrivent un procédé de fabrication de matrices par adressage mécanique. Dans le document [2], on utilise un support revêtu d'un gel de polyacrylamide que l'on active en substituant certains groupes amide par des groupes hydrazide. On fixe ensuite les oligonucléotides activés sous forme d'aldéhydes sur les groupes hydrazide en utilisant la technique de micropipetage de solutions d'oligonucléotides sur les sites sur lesquels ils devront être couplés.

Dans le cas du document [3], on part d'un support fonctionnalisé par des groupes réactifs que l'on couple à des molécules biologiques identiques. Ensuite, on découpe le support en plages individuelles correspondant chacune au couplage d'une molécule et on assemble ensuite sur une plaquette plusieurs plages

comportant des molécules différentes aux emplacements voulus.

L'emploi de ces techniques d'adressage mécanique présente l'inconvénient de nécessiter l'apport de la molécule à fixer directement sur le site à adresser. De ce fait, les dimensions du site ne peuvent être inférieures à celles de la goutte de réactif distribuée. Par ailleurs, le processus nécessite deux phases qui sont respectivement, une phase de distribution, puis une phase d'attachement covalent. De plus le support doit être modifié de telle sorte qu'une liaison covalente puisse être créée entre le support et la molécule à fixer.

Les documents : Livache T. et al, Nucleic Acids Res., 1994, 22, 15, pages 2915-2921 [4] et WO-A-94/22889 [5] décrivent des techniques d'adressages électrochimiques pour la fabrication de matrices de produits biologiques.

Dans ce cas, on part d'un support comportant plusieurs électrodes et on utilise ces électrodes pour fixer les molécules biologiques par voie électrochimique. Dans ce but, on plonge le support muni de ses électrodes dans une solution contenant la molécule à fixer, et par activation des électrodes voulues, on les recouvre de la molécule par voie électrochimique. De ce fait, les dépôts de molécules ne peuvent être réalisés que de façon successive. Par ailleurs, il est nécessaire d'utiliser un support portant des électrodes adressables individuellement, donc des systèmes complexes éventuellement multiplexés.

La présente invention a précisément pour objet un procédé de fabrication de matrices de produits biologiques sur un support, qui pallie les

inconvenients des procédés précités et qui permet de plus de réaliser l'adressage et la fixation de la molécule biologique en une seule étape, sans nécessiter une fonctionnalisation préalable du support.

## 5 Exposé de l'invention

A cet effet, l'invention propose un procédé de fabrication d'une matrice comprenant au moins un ligand fixé par voie électrochimique sur un support conducteur ou sur des zones conductrices d'un support, dans lequel on utilise au moins un élément capable de distribuer le(s) ligand(s) couplé(s) à un monomère électropolymérisable, comme électrode pour réaliser une synthèse électriquement assistée d'un polymère porteur du (des) ligand(s) sur le support conducteur ou sur les zones conductrices du support.

Selon l'invention, on utilise donc comme électrode un élément capable de distribuer le(s) ligand(s). Cet élément peut être constitué d'un réservoir contenant le ligand couplé au monomère électropolymérisable et comportant une partie conductrice, ou simplement être formé d'une électrode en forme de fil ou d'aiguille qui, après immersion dans un récipient contenant le ligand à fixer couplé au monomère électropolymérisable, est chargée par capillarité de ce ligand.

En utilisant selon l'invention une électrode formée par un tel élément, on peut mettre en contact le ligand avec le support conducteur ou les zones conductrices du support, puis le fixer directement sur le support conducteur (ou la zone conductrice) par activation électrochimique, par

exemple en créant une différence de potentiel ou en générant un courant entre le support conducteur (ou la zone conductrice) et l'élément jouant le rôle d'électrode.

- 5                   Ainsi, on réalise en une seule étape la distribution et la fixation du ligand sur le support.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, ledit élément comprend un réservoir rempli du ligand et comportant un embout de distribution  
10 isolant, et au moins une électrode disposée dans ledit réservoir, ledit embout étant en contact direct avec le support conducteur ou au moins une zone conductrice du support, lors de l'opération de fixation.

- 15                   L'embout peut être en particulier un tube capillaire que l'on pose directement sur la surface conductrice.

Selon un second mode de réalisation de l'invention, ledit élément comprend un réservoir rempli de ligand et comportant un embout de distribution  
20 conducteur, le contact entre l'embout conducteur et le support conducteur ou au moins une zone conductrice du support étant assuré par l'intermédiaire d'une goutte de ligand sortant de l'embout, lors de l'opération de fixation.

- 25                   Dans ce cas, l'embout conducteur ne sera pas en contact avec le support conducteur ou la zone conductrice. Comme précédemment l'embout conducteur peut être constitué par un tube capillaire.

Selon un troisième mode de réalisation de  
30 l'invention, ledit élément est constitué par une électrode en forme de fil ou d'aiguille, chargée extérieurement de ligand couplé au monomère électropolymérisable, le contact entre l'électrode et

le support conducteur ou une zone conductrice du support étant assuré, lors de l'opération de fixation, par l'intermédiaire d'une goutte de ligand retenue par l'électrode.

5 Dans les différents modes de réalisation décrits ci-dessus, le réservoir contient généralement une solution du ligand à fixer et du (des) réactif(s) éventuellement nécessaires pour assurer la fixation du ligand par voie électrochimique.

10 Selon l'invention, on assure en particulier la fixation électrochimique du ligand en le couplant à un monomère électropolymérisable. Dans ce cas, la solution peut comprendre le ligand couplé au monomère électropolymérisable, le monomère électropolymérisable  
15 et éventuellement un agent dopant.

Le monomère électropolymérisable peut être en particulier un de ceux décrits par Emr, S. et Yacynych, A. Electroanalysis, 1995, 7, pp. 913-323 [7]. Ils peuvent appartenir à deux catégories, ceux  
20 conduisant à des polymères conducteurs tels que le pyrrole, l'aniline, le thiophène... et leurs dérivés et ceux conduisant à des polymères isolants tels que des dérivés du phénol ou du benzène.

Dans ce cas, on obtient la fixation du  
25 ligand par électrocopolymérisation du monomère et du ligand couplé au monomère.

Le ligand peut être par exemple un oligonucléotide, un nucléotide, un acide aminé ou un peptide.

30 Un tel procédé de fixation électrochimique est décrit dans le document [5], dans le cas où le ligand est un oligonucléotide ou un nucléotide.



Dans ce dernier cas, après avoir réalisé cette fixation, on peut allonger la chaîne de l'oligonucléotide ou du nucléotide fixé en mettant en oeuvre les procédés de synthèse classique d'oligonucléotides par couplage successif des nucléotides voulus, mais en réalisant une déprotection électrochimique du dernier nucléotide fixé.

Dans le cas des peptides, on peut utiliser la même technique pour allonger la chaîne du peptide par couplage des acides aminés voulus.

L'utilisation des électrodes décrites ci-dessus pour réaliser le dépôt et la fixation par voie électrochimique d'un ligand, présente les avantages suivants.

- La procédure de dépôt et de fixation est réalisée en seule étape et elle est très rapide.

- Cette technique est facile à mettre en oeuvre car elle utilise simplement une technique de dépôt mécanique, à titre d'exemple par déplacement à l'aide d'une micropipette, mais en la couplant aux possibilités de résolution spatiale de l'électrochimie.

- Cette technique permet de réaliser plusieurs dépôts en mode parallèle.

- Par ailleurs, ce procédé ne nécessite pas l'emploi de supports modifiés ou portant des électrodes adressables individuellement.

Dans le cas d'un support en matériau conducteur, celui-ci peut être réalisé totalement en matériau conducteur de l'électricité ou être constitué d'un matériau isolant recouvert d'une couche de matériau conducteur.

Les matériaux conducteurs utilisables peuvent être de divers types, il peut s'agir entre

autres de métaux tels que l'or, l'argent et le platine, d'oxydes conducteurs tels que l'oxyde d'indium et d'étain (ITO), de carbone ou de polymères organiques conducteurs.

5 Dans le cas où le support comprend des zones conductrices, celles-ci peuvent être réalisées dans les matériaux conducteurs cités précédemment et disposées sur un support isolant.

10 Le support isolant peut être par exemple en verre, en silicium ou en matière plastique. On peut aussi utiliser un support en matériau conducteur dont les zones conductrices sont délimitées par dépôt d'un matériau isolant à la surface du matériau conducteur.

15 Selon l'invention, les zones conductrices peuvent être interconnectées électriquement, ou adressables électriquement, individuellement ou par groupe, pour pouvoir être activées séparément.

20 Le procédé de l'invention peut être mis en oeuvre de façon à fixer des ligands identiques ou différents sur des sites conducteurs différents du support.

25 Dans ce cas, on peut réaliser une fixation simultanée ou successive des ligands identiques ou différents en utilisant plusieurs éléments distribuant respectivement des ligands identiques ou différents. Dans ce cas, au moins deux des éléments peuvent être réunis pour former une tête d'impression.

30 Selon une variante de réalisation de l'invention, on réalise une fixation successive d'au moins deux ligands différents sur des sites différents du support en utilisant un seul élément mais en changeant au moins une fois le ligand distribué par cet élément.

Dans tous les modes de réalisation décrits ci-dessus, l'avantage principal réside dans le procédé de distribution-couplage du ligand, qui permet la fabrication de supports portant des molécules adressées  
5 de façon extrêmement rapide.

L'invention a encore pour objet un dispositif de fabrication d'une matrice de ligands sur un support conducteur ou sur des zones conductrices d'un support, comprenant :

- 10 - au moins un moyen de distribution d'un ligand muni d'une partie conductrice,
- des moyens pour connecter d'une part, le support conducteur ou les zones conductrices du support et, d'autre part, la partie conductrice du moyen de  
15 distribution à un générateur électrique, et
- des moyens pour disposer et/ou déplacer le support et/ou le(s) moyen(s) de distribution, l'un par rapport à l'autre, et les mettre en contact de façon à réaliser plusieurs dépôts de ligands sur le  
20 support en des emplacements différents.

Selon l'invention, le moyen de distribution peut comprendre un réservoir contenant le ligand et au moins une électrode disposée dans ledit réservoir et constituant la partie conductrice dudit moyen.

25 Selon une disposition particulière, le dispositif comprend plusieurs moyens de distribution de ligands assemblés sous forme de tête d'impression.

Selon une variante de réalisation, le dispositif de fabrication d'une matrice de ligands sur  
30 un support conducteur ou sur des zones conductrices d'un support, comprend :

- une électrode sous forme de fil ou d'aiguille apte à être chargée extérieurement dudit ligand,

5 - des moyens pour connecter d'une part, le support conducteur ou les zones conductrices du support et, d'autre part, l'électrode à un générateur électrique, et

10 - des moyens pour disposer et/ou déplacer le support et/ou l'électrode, l'un par rapport à l'autre, de façon à réaliser plusieurs dépôts de ligands sur le support en des emplacements différents.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description qui suit, donnée bien entendu à titre  
15 illustratif et non limitatif, en référence aux dessins annexés.

#### **Brève description des dessins**

La figure 1 représente schématiquement un élément comportant un réservoir de distribution d'un  
20 ligand et au moins une électrode pour fixer le ligand sur un support conducteur.

La figure 2 représente un élément analogue à celui de la figure 1 pour réaliser la fixation d'un ligand sur un support conducteur muni de zones  
25 conductrices interconnectées électriquement.

La figure 3 représentée à une échelle agrandie l'embout du réservoir de distribution de la figure 1, pour réaliser la fixation du ligand sur un support comportant des zones conductrices multiplexées.

30 Les figures 4A et 4B illustrent les étapes nécessaires pour réaliser la fixation d'un ligand sur

un support conducteur en utilisant une électrode sous forme de fil.

La figure 5 représente un élément de distribution, muni d'une entrée et d'une sortie de fluide pour assurer son remplissage et sa vidange, entre deux opérations de fixation de ligands différents.

La figure 6 représente schématiquement une tête d'impression comportant plusieurs réservoirs de distribution de ligands identiques ou différents.

#### Exposé détaillé des modes de réalisation

Sur la figure 1, on a représenté le premier mode de réalisation de l'invention dans lequel on utilise comme électrode un élément comprenant un réservoir 1 rempli du ligand à fixer et comportant un embout de distribution 1a. A l'intérieur du réservoir 1 sont disposées une contre-électrode 3 réalisée par exemple en platine ou en or, et une électrode de référence 5.

Le réservoir peut contenir un volume réactionnel suffisant pour assurer un certain nombre de dépôts, pouvant aller, par exemple jusqu'à un millier.

Dans ce premier mode de réalisation représenté sur la figure 1, on utilise un support conducteur 7 qui peut comporter un substrat en verre recouvert d'une couche d'or.

Sur cette figure, on a représenté les dépôts 9 effectués avec un tel réservoir en déplaçant par exemple le support selon les directions x et y entre deux dépôts. Dans le cas où l'embout 1a du

réservoir, ayant par exemple la forme d'un tube capillaire, est réalisé en matériau isolant, celui-ci peut être posé sur le support conducteur 7 et par création d'une différence de potentiel ou de courant entre la surface conductrice 7 et la contre-électrode 3, on peut obtenir les dépôts 9 qui sont fixés sur la surface conductrice 7 par impulsion électrique. Dans ce cas, la dimension des dépôts 9 est fixée par les dimensions de l'interface réservoir/support située dans les lignes du champ électrique entre l'électrode et la surface conductrice. Cette interface doit être la plus petite possible pour réduire la dimension du dépôt obtenu.

Le réservoir de la figure 1 peut aussi comporter un embout 1a en matériau conducteur. Dans ce cas, on réalise la fixation du ligand présent dans le réservoir en assurant le contact entre la surface conductrice 7 et l'électrode formée par l'embout 1a par l'intermédiaire d'une goutte sortant de l'embout 1a. Dans ce cas les dimensions des dépôts seront également réglées par l'interface entre le liquide et la surface conductrice située dans des lignes du champ électrique.

On peut améliorer la résolution des dépôts 9 en utilisant, comme représenté sur la figure 2, un support formé de zones conductrices interconnectées. Sur la figure 2, on a repris les mêmes références que sur la figure 1 pour désigner le réservoir 1 muni de son embout 1a, d'une électrode de référence 5 et d'une contre-électrode 3. Dans ce cas, le support est constitué par un support isolant 11 muni de zones conductrices 13, isolées les unes des autres mais interconnectées électriquement. Ces zones conductrices peuvent être réalisées en or sur un substrat en verre

ou silicium, par exemple. Dans ce cas, on obtient les dépôts 9 en distribuant au-dessus des zones conductrices le ligand, mais seules les zones conductrices en contact avec le ligand pourront être recouvertes de celui-ci. Ainsi, les dimensions des dépôts sont réglées par les dimensions des zones conductrices 13.

Dans ce cas, le support conducteur utilisé ne comporte en réalité qu'une seule électrode ; cela simplifie énormément sa fabrication et les coûts obtenus peuvent être très bas puisque de simples feuilles de matière plastique recouvertes par un matériau conducteur peuvent être utilisées.

L'utilisation d'un réseau de zones conductrices permet de réduire la taille des dépôts 9, mais pas d'augmenter la densité de la matrice. En effet, cette densité dépend directement de la dimension de l'interface entre l'embout capillaire 1a et le support et elle est limitée par les dimensions de l'embout.

On peut toutefois augmenter la densité de la matrice en utilisant un support comportant des zones conductrices formant des électrodes multiplexées, comme représenté sur la figure 3.

Sur cette figure 3, on a illustré l'embout 1a du réservoir 1 des figures 1 et 2 à une échelle agrandie et une partie d'un support conducteur isolant 11 muni de zones conductrices 13 qui sont reliées séparément à des moyens d'application d'un potentiel ou de courant pour être activées séparément. Dans ce cas, les dimensions des dépôts seront déterminées par les dimensions des zones conductrices 13 activées, comme il apparaît dans le cas de la figure 3. Les autres zones

conductrices qui sont en contact avec le ligand ne pourront conduire à une fixation de ce dernier puisqu'elles ne sont pas électroactivées. De cette façon, on peut atteindre simultanément une haute  
5 résolution dimensionnelle et une forte densité de matriçage.

Sur les figures 4A et 4B, on a représenté un autre mode de réalisation de l'invention dans lequel l'élément capable de distribuer le ligand est constitué  
10 par une électrode en forme de fil 15.

Dans ce cas, on peut utiliser un support conducteur 7 comme représenté sur la figure 4A. Pour réaliser le dépôt du ligand, l'électrode 15 est tout d'abord plongée dans un récipient  
15 17 contenant le ligand à fixer et elle retient ainsi une goutte 19 de ce ligand. On amène ensuite l'électrode comportant la goutte 19 de ligand au dessus du support conducteur 7, comme représenté sur la figure 4B en réalisant le contact électrique par  
20 l'intermédiaire de la goutte 19. En appliquant une impulsion électrique entre l'électrode 15 et le support conducteur 7, on assure la formation de dépôts 9 du ligand.

Après cette opération, on rince l'électrode  
25 15 dans un bac de rinçage 21 pour qu'elle puisse servir à nouveau pour la réalisation d'un autre dépôt 9, soit avec le même ligand, soit avec un autre ligand.

Lorsqu'on utilise ce type d'électrode, la résolution des dépôts peut être moins bonne mais dans  
30 ce cas la facilité de rinçage de l'électrode 15 est un avantage déterminant.

Le procédé de l'invention est très intéressant car il permet d'une part d'utiliser un très



petit volume de milieu réactionnel donc d'économiser les molécules d'intérêt biologique à coupler. Par ailleurs, on peut régler les dimensions des dépôts effectués sur le support alors que dans le cas des méthodes d'adressage mécanique impliquant des méthodes d'activation chimique classiques, la dimension des dépôts ne pouvait être inférieure à 50, voire 100  $\mu\text{m}$ .

Selon l'invention, on peut très facilement réduire la dimension des dépôts, non pas en diminuant la taille de la goutte, ce qui est difficile à réaliser en pratique, mais en réduisant la surface de la zone électroactivable. En effet, la résolution des dépôts est optimisée par le fait que, seule, l'interface électrode/support située dans les lignes du champ électrique est activable ; c'est-à-dire que si une goutte déborde à l'extérieur de cette zone, son contenu ne sera pas fixé sur la surface conductrice.

Ainsi, si le diamètre de l'interface entre les embouts 1a et le support conducteur est de 200  $\mu\text{m}$ , et qu'on utilise une zone conductrice ne mesurant que 10  $\mu\text{m}$  de côté, seule cette zone conductrice pourra être recouverte de molécules d'intérêt biologique.

Selon l'invention, on peut réaliser sur un support des dépôts 9 en ligands différents. Ceci peut être obtenu en fixant successivement au moins deux ligands différents sur des sites différents du support à partir d'un seul élément en changeant le ligand distribué par cet élément. Dans ce cas, les dépôts peuvent être effectués successivement, soit en changeant le contenu du réservoir 1 des éléments représentés sur les figures 1 et 2, soit en utilisant l'électrode de la figure 4 que l'on plonge dans des réactifs différents. On peut aussi utiliser un

réservoir fixe muni de moyens d'introduction et d'évacuation de ligand, c'est-à-dire comportant un système fluide d'entrée et de sortie du ligand pour changer le contenu du réservoir sans déplacer celui-ci.

5 La figure 5 illustre un tel mode de réalisation du réservoir 1 muni d'une entrée 1b et d'une sortie 1c de liquide.

Bien entendu, on peut aussi utiliser pour réaliser des dépôts 9 de ligands identiques ou  
10 différents, plusieurs éléments tels que ceux représentés sur les figures 1 et 4. Ces éléments peuvent être éventuellement assemblés pour former une tête d'impression comme représenté sur la figure 6.

Sur cette figure 6, on voit que la tête  
15 d'impression comprend un premier réservoir R1 rempli d'un ligand P1, un second réservoir R2 rempli du ligand P2 et un troisième réservoir R3 rempli du ligand P3. Avec une tête multiple de ce type, on peut effectuer sur la surface conductrice 7, trois dépôts simultanés  
20 9 réalisés respectivement en les ligands P1, P2 et P3.

On précise que les dépôts peuvent être réalisés sous atmosphère inerte ou dans un milieu liquide électrochimiquement neutre et, si possible, non miscible au milieu réactionnel contenu dans le  
25 réservoir.

Après la phase de dépôt, le support peut être rincé et utilisé de façon classique.

Les exemples suivants illustrent la réalisation de matrices d'oligonucléotides ou de  
30 peptides, à partir d'oligonucléotides ou de peptide portant un groupement pyrrole que l'on fixe sur un support conducteur en les copolymérisant par voie

électrochimique avec du pyrrole, selon le procédé décrit dans le document [5] : WO-A-94/22889

### Exemple 1

#### 5                    1 - Fabrication de supports portant des oligonucléotides.

Les supports conducteurs utilisés sont des plaques de verre recouvertes d'une couche de chrome (pour l'adhésion) et d'une couche continue de 0,5 µm  
10 d'or. Cette couche est reliée à la sortie « électrode de travail » d'un potentiostat EGG 283.

Deux oligonucléotides différents portant un groupement pyrrole en 5' sont copolymérisés sur ces supports. Leurs séquences sont les suivantes :

15

pyrM5 : 5' pyr(T)<sub>10</sub> GGAGCTGCTGGCGT 3'

pyrCP : 5' pyr(T)<sub>10</sub> GCCTTGACGATACAGC 3'

Ils ont été synthétisés par la méthode  
20 décrite par Livache et al dans [5].

Pour la fixation de ces oligonucléotides sur le support, on utilise un milieu réactionnel comprenant 0,1M de LiClO<sub>4</sub>, 20 mM de pyrrole et 1 µM d'oligonucléotide portant un groupe pyrrole en 5'.

25

Cette solution est introduite dans un réservoir en polypropylène de forme conique qui contient une contre-électrode de platine (CE) connectée au potentiostat. Ce réservoir est facilement rempli par une micropipette d'un volume pouvant varier de 50 à  
30 1000µl de milieu réactionnel. L'extrémité de ce cône a un diamètre d'environ 0,8 mm. Des cônes plus fins ou plus gros permettent d'utiliser d'autres volumes de réactif.

L'extrémité du cône est placée au contact de la surface conductrice et le copolymère est fabriqué par voltamétrie cyclique (de -0,35 à +0,85V/CE à la vitesse de 100mV/s). La charge enregistrée permet de déterminer l'épaisseur du polymère formé. Après la formation de ce premier dépôt, le cône est vidé, rincé puis rempli par un nouveau milieu réactionnel contenant un autre oligonucléotide. La plaque conductrice est déplacée (table x/y/z) et la même opération de copolymérisation est menée sur une autre plage de la surface conductrice permettant la fabrication d'un dépôt portant une autre séquence oligonucléotidique.

On prépare de cette façon deux matrices comportant uniquement des oligonucléotides pyrM5 et deux matrices comportant uniquement des oligonucléotides pyrCP.

On vérifie que les matrices d'oligonucléotides ainsi obtenues présentent les propriétés voulues pour détecter les oligonucléotides complémentaires par hybridation.

## 2 - Hybridation des oligonucléotides et détection:

Les oligonucléotides complémentaires testés sont les suivants :

- M5 complémentaires biotinylé : M5<sub>compbio</sub> ;
- CP complémentaire biotinylé : CP<sub>compbio</sub>.

L'hybridation des oligonucléotides complémentaires se déroule dans un tampon PBS (Sigma) contenant 0,5 M de NaCl, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon (Sigma), 10 mM d'EDTA et 10 nM d'oligonucléotide biotinylé complémentaire. L'hybridation est conduite à 45°C dans un volume de 20 µl durant 15 min. Un rinçage

rapide au PBS/NaCl est alors réalisé. La détection des hybrides est alors réalisée après incubation dans une solution de PBS/NaCl contenant 0,1 mg/ml de R phycoérythrine (Molecular Probe). La fluorescence est  
5 détectée par une caméra refroidie (Hamamatsu) montée sur un microscope à épifluorescence. Les résultats sont exprimés en niveaux de gris.

On observe un spot de polypyrrole d'environ 0,8 mm de diamètre dont l'intensité de fluorescence est  
10 reportée ci-dessous :

- oligonucléotide sur support pyrM5 hybridé avec M5<sub>comp</sub> bio : 110

- oligonucléotide sur support pyrM5 hybridé avec CP<sub>comp</sub> bio : 5

- oligonucléotide sur support pyrCP hybridé avec M5<sub>comp</sub> bio : 7

- oligonucléotide sur support pyrCP hybridé avec CP<sub>comp</sub> bio : 84

15 On observe ainsi une bonne spécificité d'hybridation et un rapport signal/bruit élevé.

#### Exemple 2

On suit le même mode opératoire que dans  
20 l'exemple 1, pour préparer des matrices d'oligonucléotides pyrM5 et pyrCP mais en utilisant comme support conducteur un support en matière plastique recouvert d'oxyde d'indium et d'étain (ITO).

Les résultats obtenus avec ces matrices  
25 pour la détection des oligonucléotides complémentaires biotinylés sont les suivants :

- oligonucléotide sur support pyrM5 hybridé avec M5<sub>comp</sub> bio : 95

- oligonucléotide sur support pyrM5 hybridé avec CP<sub>comp</sub> bio : 5

- oligonucléotide sur support pyrCP hybridé avec M5<sub>comp</sub> bio : 7

30 - oligonucléotide sur support pyrCP hybridé avec CP<sub>comp</sub> bio : 105

#### Exemple 3

Dans cet exemple, on suit le même mode opératoire que dans l'exemple 1 pour préparer une matrice d'oligonucléotides pyrM5 sur un support en or supporté par du verre, mais on utilise, comme contre-  
5 électrode, un fil de platine chargé du milieu réactionnel au lieu du réservoir muni intérieurement d'une électrode de platine.

Comme représenté sur la figure 4A, le fil de platine 15 est chargé du milieu réactionnel par trempage dans un réservoir 17 contenant ce milieu. Le  
10 fil portant la goutte 19 est ensuite approché du support jusqu'au contact avec la goutte. L'impulsion électrochimique est alors réalisée. Le fil est relevé puis rincé dans l'eau. Les autres dépôts sont assurés  
15 de la même façon. On obtient ainsi des dépôts d'environ 1 mm de diamètre et une fluorescence intense est observable lorsqu'on utilise la matrice pour réaliser l'hybridation de l'oligonucléotide complémentaire. Les résultats obtenus sont les suivants :

- 20 - oligonucléotide sur support pyrM5 hybridé avec M5<sub>comp</sub> bio : 400
- oligonucléotide sur support pyrM5 hybridé avec CP<sub>comp</sub> bio : 10

#### Exemple 4

De la même façon, des peptides peuvent être  
25 déposés. Des pyrroles-peptides sont synthétisés selon la procédure décrite par T. Livache et al, Biosensors and Bioelectronics 13, (1998) 629-634 [6]. Ils sont déposés selon la procédure habituelle (exemple 1). Les deux peptides ACTH (18-39) et ACTH (11-24) sont ensuite  
30 détectés par respectivement les anticorps biotinylés Mab (34-39) et Mab (18-24).

Les résultats de fluorescence après incubation avec la streptavidine phycoérythrine sont les suivants :

Peptide ACTH 18-39 avec Mab 34-39	640
Peptide ACTH 18-39 avec Mab 18-24	510
Peptide ACTH 11-24 avec Mab 34-39	10
Peptide ACTH 11-24 avec Mab 18-24	470

5

10

#### Références citées.

15

20

25

- [1] : Fodor S. et al., Science, 1991, 251, pp. 767-773.
- [2] : Khrapko K. R. et al, DNA Sequence -I.DNA Sequencing and Mapping, 1991, vol.1, pp. 375-388.
- [3] : GB-A-2 319 838.
- [4] : Livache T. et al, Nucleic Acids Res. 1994, 22, 15, pages 2915-2921.
- [5] : WO-A-94/22889.
- [6] : T. Livache et al, Biosensors and Bioelectronics 13, (1998), pages 629-634.
- [7] : Emr, S. et Yacynych, A. Electroanalysis, 1995, 7, pp. 913-323.

## REVENDICATIONS

1. Procédé de fabrication d'une matrice  
comprenant au moins un ligand fixé par voie  
5 électrochimique sur un support conducteur ou sur des  
zones conductrices d'un support, dans lequel on utilise  
au moins un élément capable de distribuer le(s)  
ligand(s) couplé(s) à un monomère électropolymérisable  
comme électrode pour réaliser une synthèse  
10 électriquement assistée d'un polymère porteur du (des)  
ligand(s) sur le support conducteur ou sur les zones  
conductrices du support.

2. Procédé selon la revendication 1, dans  
lequel ledit élément est constitué d'un réservoir  
15 contenant le ligand couplé au monomère  
électropolymérisable et comportant une partie  
conductrice.

3. Procédé selon la revendication 2, dans  
lequel le réservoir est muni de moyens d'introduction  
20 et d'évacuation de ligand.

4. Procédé selon la revendication 1, dans  
lequel ledit élément est constitué par une électrode en  
forme de fil ou d'aiguille, chargée extérieurement de  
ligand couplé au monomère électropolymérisable, le  
25 contact entre l'électrode et le support conducteur ou  
une zone conductrice du support étant assuré, lors de  
l'opération de fixation, par l'intermédiaire d'une  
goutte de ligand retenue par l'électrode.

5. Procédé selon l'une quelconque des  
30 revendications 1 à 4, dans lequel on fixe simultanément  
ou successivement des ligands identiques ou différents  
sur des sites conducteurs différents du support en



utilisant plusieurs éléments distribuant respectivement des ligands identiques ou différents.

6. Procédé selon la revendication 5, dans lequel au moins deux des éléments sont réunis pour former une tête d'impression.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel on fixe successivement au moins deux ligands différents sur des sites différents du support en utilisant un seul élément et en changeant au moins une fois le ligand distribué par cet élément.

8. Procédé selon l'une quelconque de revendications 1 à 4, dans lequel les zones conductrices sont formées par des zones de matériau conducteur disposées sur un support isolant.

9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel les zones de matériau conducteur sont interconnectées électriquement.

10. Procédé selon la revendication 8, dans lequel les zones de matériau conducteur sont adressables électriquement, individuellement ou par groupe, pour pouvoir être activées séparément.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, dans lequel le matériau conducteur est choisi dans le groupe constitué de l'or, de l'argent, du platine, de l'oxyde d'indium et d'étain (ITO), du carbone et des polymères organiques conducteurs.

12. Procédé selon la revendication 1, dans lequel chaque élément distribue une solution du ligand comprenant le ligand couplé à un monomère électropolymérisable, le monomère électropolymérisable et éventuellement un agent dopant.

13. Procédé selon la revendication 1 ou 12, dans lequel le monomère électropolymérisable est le pyrrole.

14. Procédé selon la revendication 1 ou 13, dans lequel la fixation du ligand est obtenue par électrocopolymérisation du monomère et du ligand couplé au monomère.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, dans lequel le ligand est un nucléotide, un oligonucléotide, un acide aminé ou un peptide.

16. Dispositif de fabrication d'une matrice de ligands sur un support conducteur ou sur des zones conductrices d'un support, comprenant :

15 - au moins un moyen de distribution (1) d'un ligand muni d'une partie conductrice (3),

- des moyens pour connecter d'une part, le support conducteur (7) ou les zones conductrices (13) du support et, d'autre part, la partie conductrice (3) du moyen de distribution à un générateur électrique, et

20 - des moyens pour disposer et/ou déplacer le support et/ou le(s) moyen(s) de distribution, l'un par rapport à l'autre, et les mettre en contact de façon à réaliser plusieurs dépôts de ligands sur le support en des emplacements différents.

17. Dispositif selon la revendication 16, dans lequel ledit moyen de distribution comprend un réservoir (1) contenant le ligand et au moins une électrode (3, 5) disposée dans ledit réservoir et

30 constituant la partie conductrice dudit moyen.

18. Dispositif selon la revendication 17, qui comprend plusieurs moyens de distribution de ligands assemblés sous forme de tête d'impression.

19. Dispositif de fabrication d'une matrice de ligands sur un support conducteur ou sur des zones conductrices d'un support, comprenant :

5       - une électrode (15) sous forme de fil ou d'aiguille apte à être chargée extérieurement dudit ligand,

10       - des moyens pour connecter d'une part, le support conducteur (7) ou les zones conductrices (13) du support et, d'autre part, l'électrode (15) à un générateur électrique, et

15       - des moyens pour disposer et/ou déplacer le support et/ou l'électrode (15), l'un par rapport à l'autre, de façon à réaliser plusieurs dépôts de ligands sur le support en des emplacements différents.

15

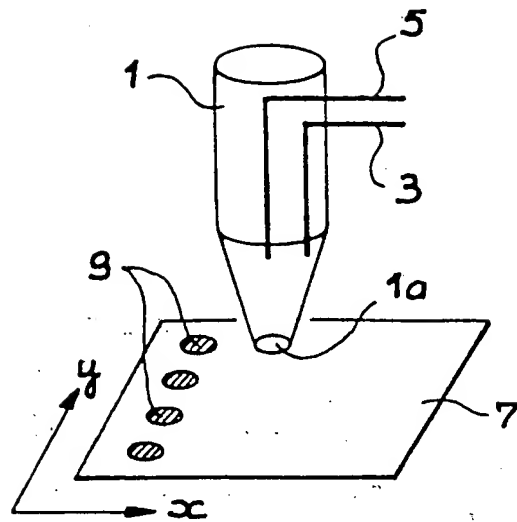
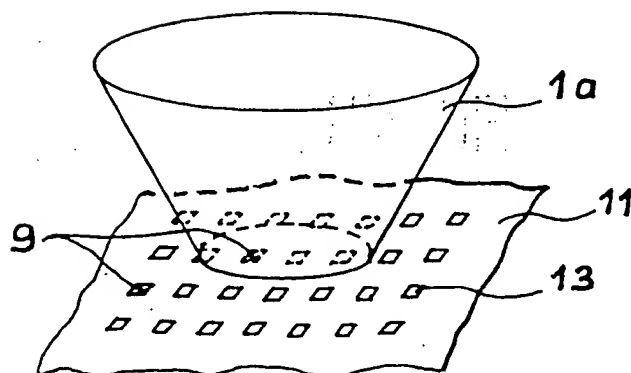
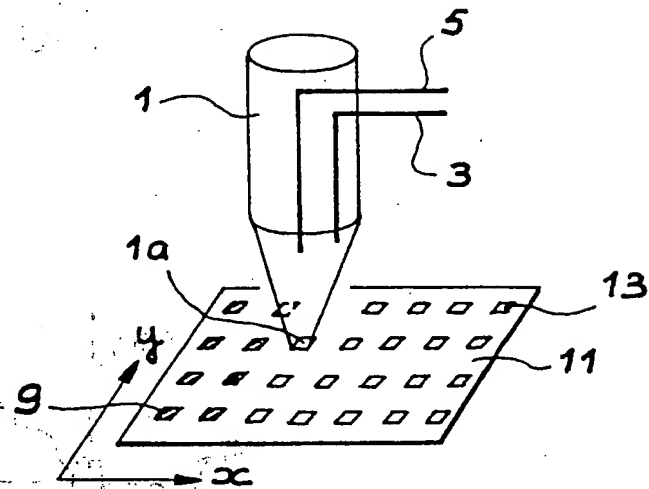


FIG. 2



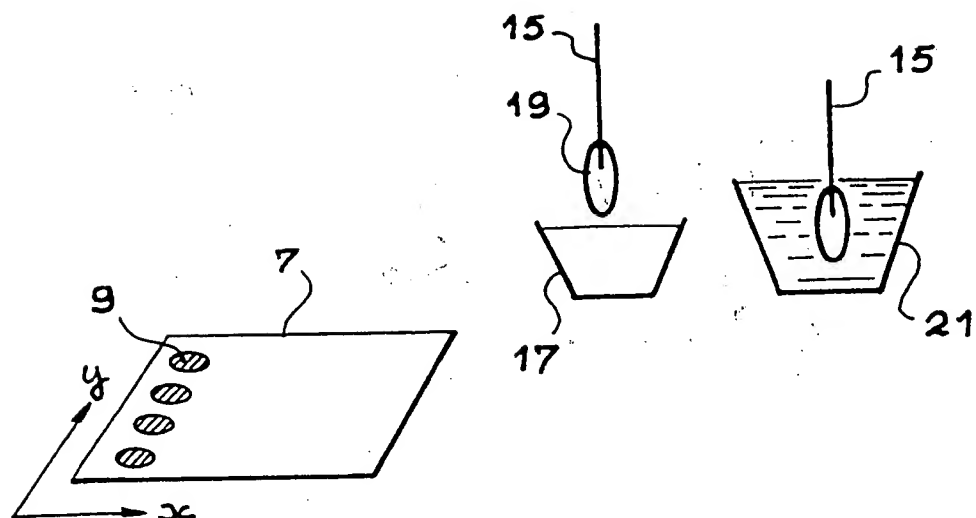


FIG. 4 A

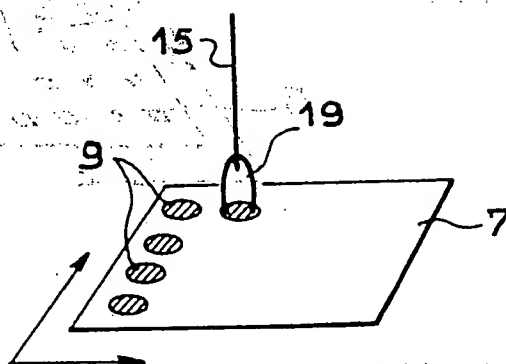


FIG. 4 B

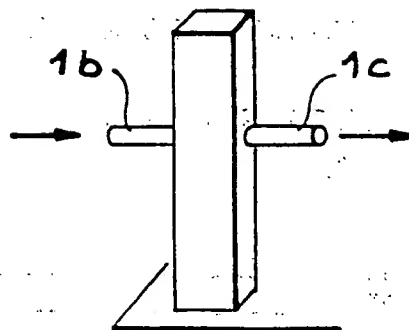


FIG. 5

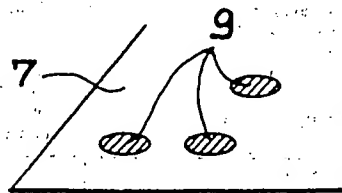
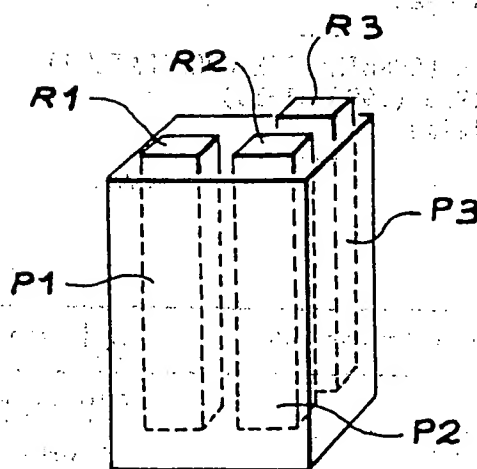


FIG. 6

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 B01J19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, COMPENDEX, INSPEC

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 58745 A (NEW YORK UNIVERSITY) 30 December 1998 (1998-12-30) abstract page 1, line 10 - line 14 page 6, line 17 - page 7, line 5 page 12, line 2 - line 33 claims; figures 1-9	1-19
A	US 5 486 337 A (TIHITO OHKAWA) 23 January 1996 (1996-01-23) the whole document	1-19
A	WO 98 01221 A (COMBIMATRIX CORPORATION) 15 January 1998 (1998-01-15) abstract; claims	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 June 2000

Date of mailing of the international search report

27/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Stevnsborg, N

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/00289

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THIERRY-LIVACHE ET AL.: "Polypyrrole DNA Chip on a Silicon Device: Example of Hepatitis G Virus Genotyping" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 255, 1998, pages 188-194, XP002114813 ACADEMIC PRESS INC. NEW YORK., US ISSN: 0003-2697 the whole document	1-19
A	US 5 828 133 A (PATRICE CAILLAT & CLAUDE MASSIT) 27 October 1998 (1998-10-27) abstract	1-19
A	W0 97 49987 A (CELLSTAT TECHNOLOGIES) 31 December 1997 (1997-12-31) abstract	
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 11, 26 December 1995 (1995-12-26) -& JP 07 213926 A (HITACHI KOKI CO. LTD.), 15 August 1995 (1995-08-15) abstract; figures -& DATABASE WPI Section Ch, Week 199541 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class J04, AN 1995-316145 XP002124060 & JP 07 213926 A (HITACHI KOKI K.K.), 15 August 1995 (1995-08-15) abstract	1



Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9858745	A	30-12-1998	AU 8074398 A EP 0988112 A	04-01-1999 29-03-2000
US 5486337	A	23-01-1996	NONE	
WO 9801221	A	15-01-1998	AU 3588497 A CA 2259523 A EP 0910467 A ZA 9705891 A	02-02-1998 15-01-1998 28-04-1999 23-07-1998
US 5828133	A	27-10-1998	FR 2742452 A EP 0780890 A JP 9195094 A	20-06-1997 25-06-1997 29-07-1997
WO 9749987	A	31-12-1997	AU 3508197 A CA 2258279 A EP 0950184 A	14-01-1998 31-12-1997 20-10-1999
JP 07213926	A	15-08-1995	NONE	

CIB 7 B01J19/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 B01J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, COMPENDEX, INSPEC

### C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 98 58745 A (NEW YORK UNIVERSITY) 30 décembre 1998 (1998-12-30) abrégé page 1, ligne 10 - ligne 14 page 6, ligne 17 - page 7, ligne 5 page 12, ligne 2 - ligne 33 revendications; figurés 1-9	1-19
A	US 5 486 337 A (TIHITO OHKAWA) 23 janvier 1996 (1996-01-23) le document en entier	1-19
A	WO 98 01221 A (COMBIMATRIX CORPORATION) 15 janvier 1998 (1998-01-15) abrégé; revendications	1-19

-/--

**X** Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

**Y** Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive, lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 juin 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale:

27/06/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Stevnsborg, N

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>THIERRY LIVACHE ET AL.: "Polypyrrole DNA Chip on a Silicon Device: Example of Hepatitis C Virus Genotyping". ANALYTICAL BIOCHEMISTRY., vol. 255, 1998, pages 188-194, XP002114813 ACADEMIC PRESS INC. NEW YORK., US ISSN: 0003-2697 le document en entier</p>	1-19
A	<p>US 5 828 133 A (PATRICE CAILLAT &amp; CLAUDE MASSIT) 27 octobre 1998 (1998-10-27) abrégé</p>	1-19
A	<p>WO 97 49987 A (CELLSTAT TECHNOLOGIES) 31 décembre 1997 (1997-12-31) abrégé</p>	
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 11, 26 décembre 1995 (1995-12-26) -&amp; JP 07 213926 A (HITACHI KOKI CO. LTD.), 15 août 1995 (1995-08-15) abrégé; figures -&amp; DATABASE WPI Section Ch, Week 199541 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class J04, AN 1995-316145 XP002124060 &amp; JP 07 213926 A (HITACHI KOKI K.K.), 15 août 1995 (1995-08-15) abrégé</p>	1

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Des le Internationale No

PCT/FR 00/00289

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9858745 A	30-12-1998	AU 8074398 A EP 0988112 A	04-01-1999 29-03-2000
US 5486337 A	23-01-1996	AUCUN	
WO 9801221 A	15-01-1998	AU 3588497 A CA 2259523 A EP 0910467 A ZA 9705891 A	02-02-1998 15-01-1998 28-04-1999 23-07-1998
US 5828133 A	27-10-1998	FR 2742452 A EP 0780890 A JP 9195094 A	20-06-1997 25-06-1997 29-07-1997
WO 9749987 A	31-12-1997	AU 3508197 A CA 2258279 A EP 0950184 A	14-01-1998 31-12-1997 20-10-1999
JP 07213926 A	15-08-1995	AUCUN	